



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : G01N 33/68, 33/569, C07K 1/12, A61K 39/00, C12M 1/40		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 96/01429 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 18. Januar 1996 (18.01.96)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP95/02593 (22) Internationales Anmeldedatum: 4. Juli 1995 (04.07.95) (30) Prioritätsdaten: P 44 23 392.2 4. Juli 1994 (04.07.94) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V. [DE/DE]; Hofgartenstrasse 2, D-80539 München (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): NIEDERMANN, Gabriele [DE/DE]; Max-Planck-Institut für Immunbiologie, Stübweg 51, D-79108 Freiburg (DE). EICHMANN, Klaus [DE/DE]; Max-Planck-Institut für Immunbiologie, Stübweg 51, D-79108 Freiburg (DE). MAIER, Bernhard [DE/US]; University of Virginia, MR 4 Building, Room 4072 c, Lane Road, Charlottesville, VA 22908 (US). (74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(54) Title: METHOD OF IDENTIFYING AND PRODUCING ANTIGEN PEPTIDES AND USE THEREOF AS VACCINES (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR IDENTIFIZIERUNG UND HERSTELLUNG ANTIGENER PEPTIDE UND DEREN VERWENDUNG ALS IMPFSTOFFE (57) Abstract The invention concerns <i>in vitro</i> methods of identifying and producing antigen peptides and peptide mixtures which simulate <i>in vivo</i> trimming of foreign or the body's own proteins; and the use of the antigen peptides or peptide mixtures identified and produced by the claimed method, for example, for identifying vaccine components against pathogens or tumour cells, or competitive or antagonistic peptides in auto-immune diseases or in the production of vaccines. (57) Zusammenfassung Die Erfindung betrifft <i>in vitro</i> Verfahren zur Identifizierung und Herstellung antigener Peptide bzw. Peptidgemische, die die <i>in vivo</i> Prozessierung von Fremd- oder Eigeneiweiß simulieren, sowie die Verwendung der mit dem erfindungsgemäßen Verfahren identifizierten und hergestellten antigenen Peptide bzw. Peptidgemische, beispielsweise zur Identifizierung von Vakzinbausteinen gegen Pathogene oder Tumorzellen oder von kompetitiven oder antagonistischen Peptiden bei Autoimmunkrankheiten oder zur Herstellung von Impfstoffen.			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauritanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LJ	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Montgolei	VN	Vietnam

Verfahren zur Identifizierung und Herstellung antigener
Peptide und deren Verwendung als Impfstoffe

BESCHREIBUNG

Die Erfindung betrifft in vitro Verfahren zur Identifizierung und Herstellung antigener Peptide und Peptidgemische, die die in vivo Prozessierung von Fremd- oder Eigeneiweiß simulieren und die Verwendung der mit dem erfindungsgemäßen Verfahren identifizierten antigenen Peptide, beispielsweise zur Identifizierung von Vakzinbausteinen gegen Pathogene oder Tumorzellen oder von kompetitiven oder antagonistischen Peptiden bei Autoimmunkrankheiten. Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung von Peptiden und Peptidgemischen als Impfstoffe sowie einen Enzymreaktor zur Herstellung von Peptidgemischen.

Eines der wichtigsten Grundprinzipien körpereigener Abwehrreaktionen ist die Präsentation von prozessiertem Fremdeiweiß durch polymorphe körpereigene Strukturen, die sogenannten Gewebeverträglichkeitsantigene (Hapthistokompatibilitätsantigene = Major Histocompatibility Complex Antigens = MHC-Antigene). Die als Peptide von den MHC-Molekülen präsentierten prozessierten Fremd- oder Eigeneiweiße werden von zwei verschiedenen Lymphozytenarten mit unterschiedlichen Funktionen im Immunsystem erkannt, den sogenannten cytotoxischen T-Lymphozyten und den Helfer-T-Lymphozyten.

Zytotoxische T-Lymphozyten (Cytotoxic T-Lymphocytes = CTLs) spielen eine bedeutende Rolle in der Abwehr sowohl gegen intrazelluläre virale und bakterielle Infektionen als auch gegen entartete Krebszellen. Sie erkennen Antigene in Form von kleinen Peptiden, die an MHC-Antigene der Klasse I, auf der Oberfläche von infizierten oder entarteten Zellen gebunden sind. Die von den abwehrenden CTLs erkannten Peptide werden in der Zelle, während

des normalen Zellzyklus durch kontinuierlichen, proteolytischen Abbau der Antigen-Proteine erzeugt.

Helfer-T-Lymphozyten spielen gleichfalls eine zentrale Rolle in der körpereigenen Abwehr. Sie üben beispielsweise eine Funktion bei der Proliferation und Differenzierung von Antigen-erkennenden B-Zellen aus. Helfer-T-Zellen erkennen Peptide, die von auf Antigen-präsentierenden Zellen lokalisierten MHC-Klasse II-Molekülen präsentiert werden. Die von den T-Helfer-Zellen erkannten Peptide sind hauptsächlich exogenen, d.h. nicht-körpereigenen oder extrazellulären Ursprungs.

Eine sehr wichtige Rolle in der Erzeugung antigener Peptide in einer Zelle, die von MHC Klasse I-Molekülen präsentiert werden, spielen Multienzymkomplexe, die Proteasomen genannt werden (A.L. Goldberg und K.L. Rock, Proteolysis, proteasomes and antigen presentation, Nature 357 (1992), 375). Diese Proteasomen können aus dem Zytosol von Zellen isoliert werden.

Der Zusammenbau der antigenen Peptide mit MHC Klasse I Molekülen findet im endoplasmatischen Reticulum (ER), nach dem Transport der Peptide durch die ER-Membran statt. Beteiligt an dem Transport der Peptide in das ER und dem Zusammenbau mit MHC Klasse I-Molekülen sind Mitglieder der "ABC-Transporter" Proteinfamilie (Higgins, ABC transporters: from microorganisms to man. Annu. Rev. Cell Biol. 8 (1992), 67), genannt "Transporter for Antigen Presentation" (TAP) (J.J. Monaco, A molecular model of MHC class-I-restricted antigen processing, Immunol. Today 13 (1992), 173; J.J. Monaco, S. Cho und M. Attaya, Transport protein genes in the murine MHC: possible implications for antigen processing, Science 259 (1990), 1723; M.J. Andrblewicz, K.S. Anderson und P. Cresswell, Evidence that transporters associated with antigen processing translocate a major histocompatibility complex class I-binding Peptide into the endoplasmic reticulum in an ATP-dependent manner., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993), 9130; J.C. Shepherd, T.N. Schumacher, P.G. Ashton-Rickardt, S. Imaeda, H.L. Ploegh, C. Janeway Jr. und S. Tonegawa,

TAP1-dependent peptide translocation in vitro is ATP dependent and peptide selective, Cell 74 (1993), 577; J.J. Neetjes und F. Momburg, Cell biology of antigen presentation. Curr. Opin. Immunol. 5 (1993) 27).

Der Zusammenbau der Peptide mit den MHC-Molekülen ist ein selektiver Prozeß und erfordert, daß das Peptid vorzugsweise eine bestimmte Größe aufweist (9 ± 1 Aminosäuren) (H.G. Rammensee, K. Falk und O. Rotzschke, Peptides naturally presented by MHC class I molecules. Annu. Rev. Immunol. 11 (1993), 213). Weiterhin müssen bestimmte "Ankeraminosäuren" in Molekültaschen der MHC Klasse I Moleküle binden. Für verschiedene MHC Moleküle wurden individuelle, allelspezifische Ankermotive bestimmt (H.G. Rammensee, K. Falk und O. Rotzschke, MHC molecules as peptide receptors. Curr. Opin. Immunol. 5 (1993), 35; K.R.O. Falk, S. Stevanovic, G. Jung, H-G. Rammensee, Allele specific Motifs Revealed by Sequencing of Self-peptides Eluted from MHC Molecules, Nature 351 (1991), 290). Mit Hilfe dieser Ankermotive wurden antigene Peptide von Proteinen von Viren, Bakterien, parasitären Protozoen und Tumorzellen vorausgesagt und identifiziert (H.J. Pamer, M.J. Bevan, Precise Prediction of a Dominant Class I MHC-restricted Epitope of *Listeria monocytogenes*, Nature 353 (1991), 852; H.J. Wallny D.K., S. Faath, G. Jung, A. van Pel, T. Boon, H-G. Rammensee, Identification and quantification of a Naturally Presented Peptide as Recognized by Cytotoxic T Lymphocytes Specific for an Immunogenic Tumor Variant, Int. Immunol. 4 (1992), 1088).

Der Prozessierungsweg der von den MHC Klasse II-Molekülen präsentierten antigenen Peptide ähnelt in weiten Bereichen dem der von MHC Klasse I-Molekülen präsentierten Molekülen. Besonderheiten ergeben sich insbesondere darin, daß die meist exogenen Proteine den endozytischen Abbauweg durchlaufen, für die Präsentation eine Länge von etwa 12 Aminosäuren aufweisen müssen und in besonderen Kompartimenten, den sogenannten Kompartimenten für die Peptidbeladung (compartments for peptide loading = CPL) mit MHC Klasse II-Molekülen assoziieren, nachdem diese den frühen

endosomalen Prozessierungsweg durchlaufen haben und die Peptidbeladung verhindernde invariante Kette abgebaut worden ist (Schmid & Jackson, Nature 369 (1994), 103-104 und darin zitierte Referenzen; Germain und Margulies, Annu. Rev. Immunol. 11 (1993), 403-450).

Nach dem Zusammenbau der MHC-Peptid-Komplexe werden diese an die Zelloberfläche transportiert, wo sie dem Immunsystem präsentiert werden.

Die Anzahl der "natürlich prozessierten und präsentierten Peptide" (NPP), die bis heute identifiziert wurden, ist relativ gering und beschränkt sich auf ein kleines Spektrum verschiedener Peptide von in großen Mengen exprimierter Proteine. Die Identifizierung antigener Determinanten, die aufgrund geringer Expressionsrate, schlechten Prozessierens, langsamen Transports in das ER oder suboptimaler Bindung an MHC-Moleküle in nur sehr geringer Menge auf der Zelloberfläche präsentiert werden, ist mit den bisher zur Verfügung stehenden Methoden, selbst unter Verwendung von hochsensitiven Verfahren, wie Tandem-Massenspektrometrie, schwierig bis unmöglich. Die allgemeingültige, experimentell empirische bestätigte Regel, daß alle in der Zelle erzeugten Peptide um den Transport in das ER und um verfügbare freie MHC-Moleküle konkurrieren, gilt auch für Peptide, die aus Proteinen pathogener Organismen oder Krebszellen entstehen. Diese Tatsache macht es extrem schwierig, die in sehr geringer Menge vorhandenen antigenen Peptide aus einem großen Überschuß endogener Peptide zu isolieren, die den größten Teil der MHC Moleküle besetzten.

Gerade die Identifizierung dieser seltenen antigenen Peptide ist jedoch von großer Bedeutung für die Impfstoffentwicklung und Immuntherapie von vielen Krankheiten. Der vorliegenden Erfindung lag somit die Aufgabe zugrunde, eine Verfahren bereitzustellen, mit dem diese seltenen, an MHC-Moleküle gebundenen, antigenen Peptide identifiziert werden können.

Eine weitere der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende Aufgabe bestand darin, antigene Peptide bzw. Peptidgemische, die antigene Peptide enthalten, auf einfache Weise herzustellen und zur Herstellung von Peptidimpfstoffen zu verwenden.

Die Lösung dieser Aufgaben wird durch die in den Ansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen bereitgestellt.

Somit betrifft ein erster Aspekt der vorliegenden Erfindung ein Verfahren zur Herstellung und Identifizierung antigener Peptide und Peptidgemische, das die folgenden Schritte umfaßt:

- (a) proteolytischer Abbau durch zelluläre Prozessierungsmechanismen von exogen zugesetzten Proteinen oder Polypeptiden, die die antigenen Peptide enthalten, zu einer Peptidgröße, die eine Assoziation mit MHC-Molekülen erlaubt;
- (b) Assoziation der in Schritt (a) erhaltenen antigenen Peptide und/oder Peptidgemische mit geeigneten MHC-Molekülen;
- (c) Isolierung der MHC-Molekül-Peptid-Komplexe;
- (d) Abtrennung der antigenen Peptide und/oder Peptidgemische von den MHC-Molekülen; und
- (e) Bestimmung der Aminosäuresequenz der in Schritt (d) erhaltenen antigenen Peptide und/oder Peptidgemische.

Ein zweiter Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung und Identifizierung antigener Peptide und Peptidgemische, das die folgenden Schritte umfaßt:

- (a) proteolytischer Abbau durch zelluläre Prozessierungsmechanismen von exogen zugesetzten Proteinen oder Polypeptiden, die die antigenen Peptide enthalten zu einer Peptidgröße, die eine Assoziation mit MHC-Molekülen erlaubt;
- (b) Fraktionierung der in Schritt (a) erhaltenen antigenen Peptide und/oder Peptidgemische;
- (c) Test der erhaltenen Fraktionen auf antigene Aktivität, vorzugsweise in einem T-Zell-Assay, und

- (d) gegebenenfalls Bestimmung der Aminosäuresequenz der in Schritt (b) erhaltenen antigenen Peptide und/oder Peptidgemische.

Unter antigenem Peptid wird hier ein Peptid verstanden, das vom Immunsystem erkannt wird und somit insbesondere in der Lage ist, eine zelluläre Immunantwort oder eine Antikörperreaktion hervorzurufen.

Eine Peptidgröße, die die Assoziation mit MHC-Molekülen erlaubt, ist bei MHC-Klasse I-Molekülen vorzugsweise eine solche mit etwa 9 ± 1 Aminosäuren, während sie bei MHC Klasse II-Molekülen vorzugsweise etwa 12 ± 1 bis 25 ± 1 Aminosäuren umfaßt.

Unter zellulären Prozessierungsmechanismen werden hier solche verstanden, die von cytosolischen Multienzymkomplexen (=Proteasomen) und weiteren, teilweise noch nicht rein dargestellten Enzymen/Enzymkomplexen ausgeübt werden sowie gegebenenfalls die nachfolgende Prozessierung ("Trimming") in Mikrosomen.

Die Isolierung der MHC-Molekül-Peptid-Komplexe kann, sofern gewünscht, vorzugsweise aus Mikrosomen- oder CLP-Lysaten erfolgen. Gemäß dem zweiten Aspekt der vorliegenden Erfindung ist jedoch eine Assoziation der proteolytisch erzeugten Peptide mit MHC-Molekülen, Isolierung der MHC-Molekül-Peptid-Komplexe und ausschließende Elution der Peptide nicht erforderlich, da antigene Peptide bzw. Peptidfraktionen des proteolytisch erzeugten Peptidgemisches auch in einem T-Zell-Assay auf ihre antigene Wirksamkeit getestet werden können.

Um die Identifizierung antigener Peptide zu erleichtern, die durch die zelluläre Prozessierungsmaschinerie erzeugt und von MHC-Molekülen an der Zelloberfläche präsentiert werden, muß das stöchiometrische Verhältnis zwischen endogenen Peptiden und antigenen Peptiden so manipuliert werden, daß die antigenen Peptide in einem großen Überschuß für den Transport in das ER und für die Bindung an MHC-Moleküle zur Verfügung stehen. Dies wird

durch die Zugabe von exogenem Protein bzw. Polypeptid in Schritt (a) erreicht. Gleichzeitig sollte die Menge von endogenen Peptiden, die bereits im ER an MHC-Moleküle gebunden sind gering sein. Damit stehen mehr freie MHC-Moleküle für die antigenen Peptide zur Verfügung.

Gegenüber den bisher angewandten Methoden und Verfahren der Peptidelution aus Zell-Lysaten, beziehungsweise aus affinitäts-gereinigten MHC-Molekülen, kann durch das hier beschriebene Verfahren eine starke Anreicherung von spezifischen exogenen, z.B. aus einem Pathogen abgeleiteten Peptidepitopen erreicht werden. Dies ermöglicht es, neben immundominanten Peptidepitopen auch subdominante Peptidepitope zu identifizieren, die unter normalen physiologischen Verhältnissen in zu geringer Konzentration in MHC-gebundener Form an die Zelloberfläche gelangen, um spezifische CTL-Vorläuferzellen zur Expansion und Differenzierung zu induzieren.

Dominante Epitope repräsentieren oft Proteine oder Proteinabschnitte, die zwar in großen Mengen von dem Pathogen gebildet werden (z.B. Hüllproteine von Viren), die aber nicht unbedingt unter einem so hohen funktionalen Selektionsdruck stehen, als daß sie nicht in gewissen Grenzen veränderbar sind. Dies führt dazu, daß z.B. bei einer Infektion mit Human-Immunodeficiency-Virus (HIV) die meisten Immunantworten gegen Proteinabschnitte gemacht werden, die sehr variabel sind. Die dominanten Epitope überdecken mengenmäßig die subdominanten Epitope bei der MHC-gebundenen Präsentation. Dabei ist die Konzentration der subdominanten Epitope auf der Zelloberfläche so gering, daß sie nicht als Signal zur Differenzierung der T-Zellen zu CTLs ausreicht.

Da grundsätzlich alle Proteine von der zellulären Maschinerie prozessiert und präsentiert werden, wird bei dem erfindungsgemäßen Verfahren eine hohe Anreicherung von Peptidepitopen erreicht, die unter normalen Bedingungen subdominant sind. Wenn man CTLs gegen Epitope erzeugen kann, die Peptidabschnitte repräsentieren, die unter solch hohem funktionalen Selektions-

druck stehen, daß sie eine sehr eingeschränkte genetische Variabilität besitzen, kann man mit Hilfe solcher CTLs eine sehr effektive Immunantwort erzeugen. Einmal aktivierte CTLs erkennen nämlich auch subdominante Epitope, die in geringsten Konzentrationen auf befallenen Zellen präsentiert werden, wogegen die Grenzkonzentration für die Aktivierung der T-Zellen und Differenzierung zu CTLs wesentlich höher liegt.

Diesem Umstand verdanken viele Viren ihre Persistenz, da die dominanten Epitope ständig mutieren und damit das Virus insgesamt sich der Immuneliminierung, trotz ständig vorhandener Immunreaktionen, entzieht. Das erfindungsgemäße Verfahren kann somit vorteilhafterweise zur Identifizierung und Herstellung viraler antigener Peptide eingesetzt werden, die für Prophylaxe und Immuntherapie gegen derartige Viren verwendet werden können.

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht es, antigene Peptide aus zellulären MHC-Molekülen in Mengen zu isolieren, die um mehrere Größenordnungen über den Mengen liegen, die man mit im Stand der Technik bekannten Methoden erreichen kann. Dabei können antigene Peptide direkt aus vollständigen Mikrosomenlysaten, Zell-Lysaten oder aus affinitätsgereinigten, beladenen MHC-Molekülen gewonnen werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens sind die MHC-Moleküle MHC Klasse I-Moleküle. Geeignete MHC-Moleküle sind solche Moleküle, die eine passende Konformation aufweisen, um die antigenen Peptide präsentieren zu können.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt der proteolytische Abbau der Proteine oder Polypeptide durch Proteasomen aus kultivierten Zellen, insbesondere humanen Zellen. Diese Ausführungsform ist besonders bevorzugt, wenn die Peptide aus dem degradativen Abbau der Proteine oder Polypeptide durch MHC Klasse I-Moleküle präsentiert werden sollen. Die Proteasomen werden vorzugsweise nach dem von Boes et al., J. Exp. Med. 17 (1994), 901 beschriebenen Verfahren

aus kultivierten Zellen, insbesondere humanen Zellen isoliert. Praktischerweise wird das Protein mit den isolierten Proteasomen in Mikrosomen-Standardpuffer (Levy et al., Cell 67 (1991), 265) für unterschiedliche Zeiträume (0,5 bis 96 Stunden) bei 37°C inkubiert. Als Quelle für Proteasomen kann auch beispielsweise die diesen Enzymkomplex stark exprimierende humane Zelllinie K-562 (ATCC-Nr. CCL 243) dienen.

Die isolierten Proteasomen können ohne weitere Behandlung zum proteolytischen Abbau exogen zugesetzter Proteine oder Polypeptide verwendet werden. In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden jedoch Proteasomen verwendet, die an einen festen Träger immobilisiert sind. Die Immobilisierung kann durch chemische Koppelung z.B. mit Hilfe eines bifunktionalen Linkerreagens erfolgen. Andererseits kann die Immobilisierung auch durch Immunadsorption mit Hilfe immobilisierter, gegen Proteasomen gerichteter Antikörper erfolgen.

Die gemäß erstem Aspekt der vorliegenden Erfindung zur Assoziation mit den durch proteolytischen Abbau erhaltenen antigenen Peptiden und/oder Peptidgemischen verwendeten MHC Klasse I-Moleküle können aus zellulären Mikrosomen, Zellen eines Patienten oder modifizierten Zellen mit Spezifität für ein einziges MHC Klasse I-Molekül (K. Takahashi, L.C. Dai, T.R. Fuerst, W.E. Biddison, P.L. Earl, B. Moss und F.A. Ennis. Specific lysis of human immunodeficiency virus type 1-infected cells by a HLA-A3.1-restricted CD8 + cytotoxic T. lymphocyte clone that recognizes a conserved peptide sequence within the gp41 subunit of the envelope protein. Proc. Natl. Acad. Sci., 88 (1991) 10277-10281; C.C. Winter, B.M. Carreno, R.V. Turner, S. Koenig und W.B. Biddison. The 45 pocket of HLA.A2.1 plays a role in presentation of influenza virus matrix peptide and alloantigens. J. Immunol. 146 (1991) 3508-3512) stammen. Andererseits kann man auch rekombinante MHC Klasse I-Moleküle verwenden (Matsumura, M., Saito, Y., Jackson, M.R., Song, E.S. und Peterson, P.A.. In vitro peptide binding to soluble empty class I MHC molecules isolated

from transfected *Drosophila melanogaster* cells. J. Biol. Chem. 26 (1992) 23589).

Wenn die MHC Klasse I-Moleküle aus zellulären Mikrosomen stammen, erfolgt die Isolierung der Mikrosomen vorzugsweise nach dem von Saraste et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 (1986), 6425 beschriebenen Verfahren. In diesem Fall kann die Assoziation der antigenen Peptide mit den MHC Klasse I-Molekülen durch Inkubation der Peptide mit Mikrosomen erfolgen. Die nicht beladenen MHC Klasse I-Moleküle sind vor allem in der mikrosomalen Fraktion vorhanden (Levy et al., a.a.O.). Demzufolge ist es möglich, die nach dem Proteasomen-Abbau erhaltenen antigenen Peptide direkt mit der mikrosomalen Fraktion des endoplasmatischen Retikulums zu inkubieren, um MHC Klasse I-Molekül-antigenes Peptid-Komplexe zu erhalten. Die Inkubation erfolgt vorzugsweise 1 Minute bis 36 Stunden bei 37°C.

Eine weitere bevorzugte erfindungsgemäße Ausführungsform betrifft ein Verfahren, wobei die MHC-Moleküle MHC Klasse II-Moleküle sind. In diesem Fall kann der proteolytische Abbau der Proteine oder Polypeptide durch endosomale und/oder lysosomale Enzyme erfolgen, vorzugsweise in Gegenwart geeigneter MHC-Klasse II-Moleküle. Diese Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist besonders dann von Vorteil, wenn die antigenen Peptide durch MHC Klasse II-Moleküle präsentiert werden sollen. Wie bereits vorstehend erwähnt, werden die auf MHC Klasse II-Moleküle zu beladenen antigenen Peptide nicht hauptsächlich durch Abbau mittels eines Proteasomen-Komplexes, sondern durch proteolytischen Abbau in endosomalen/lysosomalen Kompartimenten prozessiert.

Die für die Bildung mit antigenem Peptid bereitzustellenden MHC Klasse II-Moleküle können aus trans-Golgi-Vesikeln, Endosomen, CPLs, Zellen eines Patienten oder modifizierten Zellen mit Spezifität für ein einziges MHC Klasse II-Molekül (Riberdy, J.M., Avva, R.R., Geuze, H.J. und Cresswell, P., Transport and intracellular distribution of MHC class II-molecules and

associated invariant chain in normal and antigen-processing mutant cell lines. J. Cell. Biol. 125 (1994), 1225-1237) stammen. Andererseits kann man auch rekombinante MHC Klasse II-Moleküle (Arimilli, S., Cardoso, C., Mukku, P., Baichwal, V. und Nag, B., Refolding and reconstitution of functionally active complexes of human leucocyte antigen DR2 and myelin basic protein from recombinant alpha and beta chains. J. Biol. Chem. 270 (1995) 971) verwenden.

MHC Klasse II-Moleküle sind, soweit im Stand der Technik bekannt ist, im Falle der CPLs zumindest bei Eintritt in das Kompartiment durch die invariante Kette daran gehindert, eine Bindung mit einem geeigneten antigenen Peptid einzugehen. Allerdings ist davon auszugehen, daß in diesen Kompartimenten der proteolytische Abbau der invarianten Kette beginnt bzw. vollendet wird, so daß die MHC Klasse II-Moleküle nachfolgend mit dem gewünschten antigenen Peptid assoziieren können.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Assoziation der antigenen Peptide mit MHC Klasse II-Molekülen durch gemeinsame Inkubation in CPLs.

Mit dieser Ausführungsform des erfindungsgemäßen in vitro-Verfahrens wird die in vivo-Situation der Beladung der MHC Klasse II-Moleküle mit antigenen Peptiden nachgeahmt. Daher sollte diese bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens in besonderem Maße dazu führen, daß die tatsächlich interessanten antigenen Peptide von den MHC Klasse II-Molekülen erkannt und für weitere Untersuchungen zur Verfügung gestellt werden können.

Die zum proteolytischen Abbau eingesetzten Proteine oder Polypeptide können natürlichen Ursprungs sein. Für diese Ausführungsform ist es notwendig, daß eine Quelle an natürlichem Protein bzw. Polypeptid zur Verfügung gestellt wird, die ausreichende Mengen für eine effektive Beladung und Präsentation durch eine genügend hohe Anzahl von MHC-Molekülen ermöglicht.

Andererseits können die Proteine oder Polypeptide rekombinanten oder synthetischen Ursprungs sein. Diese Ausführungsform ist besonders bevorzugt, da rekombinante oder synthetische Polypeptide mit konventionellen Verfahren leichter herstellbar sind als die Isolierung dieser Proteine oder Polypeptide aus natürlichen Quellen. Durch die in den letzten Jahren entwickelten Verfahren ist es besonders einfach, rekombinante Proteine in ausreichenden Mengen zur Verfügung zu stellen, die dann durch die zelluläre Prozessierungsmaschinerie abgebaut und in großen Mengen von freien MHC-Molekülen aufgenommen werden können. Synthetische Polypeptide oder Proteine sind nach Standardverfahren beispielsweise mit F-moc Chemie unter Verwendung eines Peptidsynthesegerätes von Applied Biosystems Inc. oder eines entsprechenden anderen Gerätes herstellbar.

Die Anzahl an geeigneten MHC Klasse II-Molekülen kann gegebenenfalls durch in vitro-Translationen und/oder Translokation von MHC Klasse II-Molekülen in Mikrosomen bzw. trans-Golgi-Vesikeln erhöht werden.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens stammen die MHC-Moleküle aus TAP-negativen Zelllinien. Ein Beispiel für eine derartige Zelllinie ist T2. Diese Zelllinie und ihre Herstellung ist beschrieben in Levy et al., a.a.O., Salter et al., EMBO J.5 (1986), 943-949, Salter et al., Immunogenetics 21 (1985), 235-246 und De Mars et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985), 8183-8187. Nach den dort beschriebenen technischen Lehren kann der Fachmann weitere TAP-negative Zelllinien herstellen.

Die vorstehend beschriebenen Ausführungsformen erhöhen entweder die relative Menge an interessierendem abzubauenem Protein oder sie erhöhen die Anzahl an freien MHC-Molekülen.

So wird durch Zugabe von exogenen natürlichen, rekombinanten oder synthetischen Polypeptiden zur zellulären Prozessierungs- und Präsentierungsmaschinerie ein Überschuß von exogenen antigenen

Peptiden, die mit endogenen, zellulären Peptiden in Konkurrenz treten, geschaffen. Die Menge an freien MHC-Molekülen in Mikrosomen kann durch in vitro Translation und Translokation von MHC-Molekülen in Mikrosomen nach im Stand der Technik bekannten Verfahren und durch Verwendung von Mikrosomenpräparationen aus TAP-negativen Zelllinien erhöht werden. Letztere Ausführungsform verhindert dabei, daß die MHC-Moleküle bereits vor dem Kontakt mit aus exogenen Quellen stammendem antigenen Peptid mit endogenen Peptiden beladen und damit blockiert sind.

Die Isolierung der MHC-Molekül-Peptid-Komplexe gemäß erstem Aspekt der vorliegenden Erfindung kann z.B. durch Präzipitation mit Konformationsepitop-spezifischen anti-MHC-Antikörpern erfolgen. Derartige Antikörper können polyclonalen oder monoclonalen Ursprungs sein. Verfahren zur Immunpräzipitation mit derartigen Antikörpern sind im Stand der Technik gut bekannt (vgl. z.B. Burgert & Kvist, Cell 41 (1985), 987).

Die Abtrennung der antigenen Peptide von den MHC-Molekülen kann durch Elution, vorzugsweise Säureelution der Peptide aus den MHC-Molekülen erfolgen. Auch derartige Verfahren zur Elution, vorzugsweise zur Säureelution sind im Stand der Technik ausreichend beschrieben worden (vgl. Germain und Margulies; a.a.O. und darin zitierte Referenzen).

Auf die Elution folgt vorzugsweise ein Peptidreinigungsschritt bzw. Peptidfraktionierungsschritt z.B. unter Verwendung von HPLC, Gelfiltration oder Kapillarelektrophorese. Ein derartiger Reinigungs- bzw. Fraktionierungsschritt ist besonders vorteilhaft, wenn eine heterogene Fraktion an Peptiden vorgefunden wird. Insbesondere ist bei prozessierten Peptiden, die an MHC Klasse II-Moleküle binden, aufgrund oftmals versetzter NH_2 -Enden eine nachfolgende Sequenzierung der Peptide ohne vorherige Reinigung bzw. Fraktionierung der relevanten antigenen Peptide oft nur schwer möglich. Darüber hinaus ist eine vorherige Reinigung aber auch für Peptide, die an MHC Klasse I-Moleküle binden, von Vorteil.

Als HPLC-Verfahren wird vorzugsweise eine Reverse Phase-HPLC eingesetzt.

Durch die oben genannte Fraktionierungsprozedur werden Fraktionen von Peptiden und/oder Peptidgemischen mit definierter Größe erhalten. Dieser Fraktionierungsschritt wird gemäß dem zweiten Aspekt der vorliegenden Erfindung direkt nach dem proteolytischen Abbau, d.h. ohne vorherige Assoziierung mit MHC-Molekülen durchgeführt. Überraschenderweise wurde nämlich festgestellt, daß durch den proteolytischen Abbau antigene Peptide bereits in so hoher Ausbeute gefunden werden, daß auf den Schritt der Assoziierung mit MHC-Molekülen oftmals verzichtet werden kann.

Zur Identifizierung von antigenen Peptidfraktionen wird vorzugsweise ein T-Zell-Assay durchgeführt. Hierzu werden durch Proteasomen prozessierte Peptide, die an MHC I-Moleküle binden können, insbesondere durch einen Standardlysetest mit Hilfe von cytotoxischen T-Zellen getestet, die vorzugsweise spezifisch für das Protein oder Polypeptid oder ein das Protein oder Polypeptid enthaltendes Patogen sind. Die cytotoxischen Zellen können beispielsweise aus polyclonalen CTL-Linien oder T-Zell-Klonen stammen.

Ein derartiger Standardlysetest ist beispielsweise das im Stand der Technik bekannte Chromfreisetzungsverfahren; vgl. z.B. Boes et al., a.a.O.

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht die Herstellung und Identifizierung von antigenen Peptiden, die natürlich prozessierten und präsentierten Peptiden weitestgehend entsprechen. Dies wird durch die Verwendung eines geeigneten Nachweissystems für antigene Peptide, z.B. von polyclonalen, antigenspezifischen CTL-Linien erreicht. Diese CTLs können in vitro aus peripheren Blut-Lymphozyten, durch den Kontakt mit autologen, Epstein-Barr-Virus transformierten B-Zellen (EBV-B-Zellen), die das rekombinante Antigen im Überschuß exprimieren, generiert werden.

Ein weiteres, im Stand der Technik bekanntes Verfahren, epitop-spezifische CTLs zu erzeugen, ist die Stimulierung mit peptidgepulsten EBV-B-Zellen.

Diese CTLs können auch zum Absuchen von besonders subdominanten Peptiden verwendet werden, die gerade noch ausreichend natürlich prozessiert werden, um detektiert werden zu können.

Durch die Verwendung von vorzugsweise rekombinantem Antigen aus exogenen Quellen werden auf den EBV-B-Zellen auch selten prozessierte antigene Peptide in Kombination mit MHC-Molekülen präsentiert, die in vivo in zu geringer Anzahl präsentiert werden, um CTLs zu aktivieren. Der Standardlyseset stellt die Kontrollinstanz dar für die Authentizität der identifizierten antigenen Peptide mit natürlich prozessierten und präsentierten Antigenen.

Bei Peptiden bzw. Peptidgemischen, die an MHC Klasse II-Moleküle binden, erfolgt die Identifizierung der aktiven Fraktionen vorzugsweise durch einen im Stand der Technik bekannten T-Zell-Proliferationstest.

Schließlich kann eine Bestimmung der Aminosäuresequenz von antigenen Peptiden und/oder Peptidgemischen durch Sequenzierung unter Verwendung von vorzugsweise automatisierter Edman-Chemie oder Massenspektrometrie, z.B. Tandem-Massenspektroskopie erfolgen.

Sowohl die Edman-Chemie als auch die Tandem-Massenspektrometrie z.B. als Elektrospray-Ionisierungs-Tandem-Massenspektrometrie in Verbindung mit Mikrokapillar-HPLC gehören zum Stand der Technik (vgl. z.B. Hunt et al., Science 255 (1992), 1261-1264).

Das zum proteolytischen Abbau eingesetzte Protein oder Polypeptid kann (a) einem Pathogen oder einem Protein oder Polypeptid oder einem Teil davon entsprechen, das/der aus einem Pathogen stammt,

(b) ein Tumorantigen oder ein Teil davon sein oder (c) ein Autoimmunantigen oder ein Teil davon sein.

Mit dieser Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens können klinisch relevante Pathogene, Tumorantigene oder Autoimmunantigene auf ihre antigenen Peptidbestandteile nach zellulärer Prozessierung hin untersucht werden.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist das antigene Peptid ein subdominantes Peptid. Die Vorzüge des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Identifizierung subdominanter antigener Peptide wurden bereits vorstehend erörtert. Diese bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist daher insbesondere dann einsetzbar und von Vorteil, wenn derartige subdominante antigene Peptide vom Immunsystem erkannt werden sollen und seine nachfolgende Stimulierung einsetzen soll, um das Pathogen/ Tumorantigen/Autoimmunantigen wirksam zu bekämpfen.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die Auswahl an präsentierbaren antigenen Peptiden erhöht durch Transfektion einer Zelllinie, in der der zelluläre Prozessierungsmechanismus abläuft und die MHC-Moleküle exprimieren kann mit TAP-Moleküle codierenden Genen, vorzugsweise aus verschiedenen Spezies.

Die für TAP-Moleküle codierenden Gene sind cloniert (Levy et al., a.a.O., Germain & Margulies, a.a.O.) bzw. können nach im Stand der Technik bekannten Verfahren (z.B. Hybridisierung mit Sonden aus konservierten Bereichen des Gens) aus weiteren Spezies isoliert und cloniert werden. Da vermutet wird, daß die Peptidbindung an TAP ein selektiver Prozeß ist, kann durch Transfektion mit weiteren TAP-Molekülen aus verschiedenen ethnischen Gruppen (wobei von einem gewissen Polymorphismus zwischen verschiedenen ethnischen Gruppen ausgegangen wird), aus der Ratte, Maus, Hamster, um nur einige Beispiele zu nennen, die absolute Anzahl verschiedener Peptid-bindender Konformation auf TAP-Molekülen

erhöht werden. Damit können absolut mehr verschiedene Peptide auf geeignete MHC-Moleküle geladen werden, wodurch insbesondere auch die Möglichkeiten zur Identifizierung subdominanter antigener Peptide erhöht werden.

Die Gene sind vorzugsweise in Expressionsvektoren cloniert. Besonders bevorzugt ist die Transfektion von TAP-negativen Zelllinien mit derartigen Genen.

Ein dritter Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung antigener Peptidgemische, umfassend die Schritte:

- (a) proteolytischer Abbau durch zelluläre Prozessierungsmechanismen von exogen zugesetzten Proteinen oder Polypeptiden, die die antigenen Peptide enthalten, zu einer Peptidgröße, die eine Assoziation mit MHC-Molekülen erlaubt,
- (b) Gewinnung der Peptidgemische.

Überraschenderweise wurde festgestellt, daß die komplexen Peptidgemische, die durch den Verdau von antigenen Proteinen oder Polypeptiden, insbesondere durch Proteasomen entstehen, als Peptidimpfstoff zur Induktion von CTLs in der Lage sind, ohne daß Einzelpeptidsequenzen identifiziert bzw. isoliert werden müssen.

Darüber hinaus hat die Verwendung der Peptidgemische als Impfstoff gegenüber den bisher verwendeten Einzelpeptiden einen erheblichen Vorteil. Mit bislang bekannten Einzelpeptidimpfstoffen können cytotoxische T-Lymphozyten, die vor allem für die Eliminierung von virusinfizierten Zellen oder Tumorzellen wichtig sind, nur bedingt induziert werden, da ein spezifisches MHC-Molekül nur immer einen spezifischen Satz von Peptiden binden kann. Somit kann ein Peptidepitop, das für einen Patienten wirksam ist, für einen anderen Patienten völlig unwirksam sein. Aufgrund des enormen MHC-Polymorphismus in der menschlichen Population würde es vermutlich Jahre oder Jahrzehnte dauern, bis

für alle MHC-Moleküle die Epitope relevanter viraler oder Tumorantigene identifiziert sind. Außerdem müßte von jeder zu immunisierenden Person eine MHC-Typisierung vorgenommen werden und dann eine entsprechende Auswahl bzw. Mischung von Peptiden für die jeweilige MHC-Konstellation verabreicht werden.

Andererseits ist der aus dem Stand der Technik bekannte Einsatz von attenuierten Viren, mit denen cytotoxische T-Zellen effektiv induziert werden können, gefährlich, da die Viren bei einer Mutation wieder zu pathogenen Viren revertieren können. Mit abgetöteten Viren oder Proteinimpfstoffen können wiederum meist keine zytotoxischen T-Lymphozyten induziert werden, da die antigenen Proteine nicht ins Zytosol, dem Ort der Prozessierung von Antigenen für die Präsentation über MHC Klasse I-Moleküle gelangen können.

Durch die Verwendung von komplexen Peptidgemischen nach proteolytischem Abbau von Antigenen, insbesondere in Proteasomen, als Peptidimpfstoff, kann überraschenderweise eine Induktion von cytotoxischen T-Zellen erreicht werden. Die Vorteile eines die komplexen Peptidgemische enthaltenden Impfstoffes bestehen insbesondere darin, daß die Identifizierung einzelner Epitope für verschiedene MHC-Moleküle und eine MHC-Typisierung der zu impfenden Personen nicht mehr nötig ist. Weiterhin müssen die entsprechenden Peptidimpfstoffe nicht mehr durch aufwendige und kostspielige Methoden synthetisch hergestellt werden, sondern können auf einfache und effiziente Weise durch enzymatischen Verdau rekombinanter Polypeptide oder Proteine hergestellt werden.

Zur Erhöhung der Ausbeute der beim proteolytischen Abbau von Proteinen oder Polypeptiden entstehenden Peptide und/oder Polypeptide wird vorzugsweise ein Enzymreaktor verwendet, umfassend:

einen Behälter, der zelluläre Prozessierungsenzyme, insbesondere Proteasomen, enthält, die den Abbau der Proteine oder Polypeptide

zu einer Peptidgröße bewirken, die eine Assoziation mit MHC-Molekülen erlaubt, wobei der Behälter mindestens eine Eintrittsöffnung zur Zufuhr von Proteinen und mindestens eine Austrittsöffnung zur Entnahme der prozessierten Peptide aufweist. Der Behälter ist vorzugsweise thermostatierbar.

Vorzugsweise sind die zellulären Prozessierungsenzyme durch bekannte Methoden - wie oben diskutiert - auf einem Trägermaterial oder/und an Wänden des Behälters immobilisiert. Die Immobilisierung kann durch chemische Kopplung oder vorzugsweise durch Immunadsorption erfolgen. Die Enzyme können jedoch auch frei in Lösung vorliegen.

Die Austrittsöffnung des Enzymreaktors ist vorzugsweise derart ausgebildet, daß sie den Durchtritt der prozessierten Peptide, aber nicht den Durchtritt der als Ausgangsmaterial verwendeten Proteine oder Polypeptide erlaubt. Die Austrittsöffnung des Enzymreaktors erlaubt vorzugsweise auch nicht den Durchtritt der Enzyme. Hierzu umfaßt die Austrittsöffnung vorzugsweise eine Filtrationseinheit, z.B. ein Amicon-Filter (Molekulargewichtstrenngrenze 3000 bis 10000 Dalton).

Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung auch eine neue Vorrichtung zum proteolytischen Abbau von Proteinen oder Polypeptiden, welche die oben genannten Merkmale aufweist. Mit dieser Vorrichtung ist eine kontinuierliche Durchführung des Verfahrens möglich, d.h. die als Ausgangsmaterial verwendeten Proteine oder Polypeptide können dem Reaktor kontinuierlich zugeführt und die prozessierten Peptide kontinuierlich entnommen werden.

Die Erfindung betrifft schließlich auch die Verwendung der nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten antigenen Peptide zur Identifizierung von Vakzinbausteinen gegen Pathogene oder Tumorzellen oder von kompetitiven oder antagonistischen Peptiden bei Autoimmunkrankheiten.

Die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren identifizierten und/oder hergestellten antigenen Peptide können beispielsweise alleine oder gekoppelt an einen Träger nach im Stand der Technik bekannten Verfahren zur Immunisierung gegen Pathogene oder aber zur Prophylaxe gegen oder/und zur Therapie von Tumorwachstum eingesetzt werden.

Kompetitive oder antagonistische Peptide können bei der Prophylaxe und Therapie von Autoimmunkrankheiten verwendet werden, um zuvor identifizierte, Autoimmunreaktionen stimulierende Peptide aus der Bindung an MHC-Moleküle zu verdrängen. Sie können ferner zur kompetitiven Bindung an T-Zell-Rezeptoren verwendet werden, ohne die T-Zellen zu stimulieren.

Wie bereits oben ausgeführt, eignen sich die Peptide oder Peptidgemische, die durch das erfindungsgemäße Verfahren erhältlich sind, zur Herstellung eines Impfstoffes. Dabei können die durch proteolytischen Abbau erhaltenen komplexen Peptidgemische gegebenenfalls nach einer Größenfraktionierung eingesetzt werden, ohne daß vorher eine Auftrennung in Einzelpeptide erfolgt.

Vorzugsweise enthält der Impfstoff zusätzlich ein Adjuvans, das beispielsweise aus Aluminiumhydroxyd, Emulsionen von Mineralölen (vgl. Freundsches Adjuvans), Saponin, Siliciumverbindungen, Thioharnstoff, Liposomen, Quil-A-enthaltenden Liposomen, ISCOMS, Lipopeptiden, Endotoxinen von gram-negativen Bakterien, Exotoxinen von gram-positiven Bakterien und Haemophilus pertussis ausgewählt werden kann.

Weiterhin ist bevorzugt, daß der Peptidimpfstoff mehrmals verabreicht wird, z.B. in wöchentlichen, monatlichen oder halbjährlichen Intervallen. Die Dosierung des Peptidimpfstoffes ist vorzugsweise 10-1000 µg, stärker bevorzugt 50-500 µg, besonders bevorzugt 50-200 µg und beispielsweise 100µg.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird der Peptidimpfstoff in Kombination mit einem Protein- oder Polypeptidimpfstoff verabreicht. Der Protein- oder Polypeptidimpfstoff kann das zur Herstellung des Peptidimpfstoffs als Ausgangsmaterial verwendete Protein oder Polypeptid oder/und ein anderes Protein oder Polypeptid, das vorzugsweise aus dem gleichen Pathogen stammt, als Wirkstoff enthalten. Durch Verabreichung der Kombination aus Protein- bzw. Polypeptidimpfstoff und Peptidimpfstoff kann eine simultane Stimulierung von Helfer-T-Zellen und cytotoxischen T-Zellen erreicht werden, wodurch eine erhöhte Antikörperbildung und eine erhöhte zelluläre Immunantwort erreicht wird.

In diesem Zusammenhang ist anzumerken, daß die gemeinsame Verabreichung von Peptidimpfstoff und Polypeptid - bzw. Proteinimpfstoff nicht nur auf die durch das erfindungsgemäße Verfahren hergestellten Peptide oder/und Peptidgemische beschränkt ist, sondern bei beliebigen Peptidimpfstoffen erfolgen kann. Der Begriff "gemeinsame Verabreichung" bedeutet in diesem Zusammenhang, daß der Peptidimpfstoff und der Protein- bzw. Polypeptidimpfstoff sowohl in einer einzigen Dosierungseinheit als auch in getrennten Dosierungseinheiten gleichzeitig oder zu verschiedenen Zeitpunkten während der Behandlungsdauer verabreicht werden können.

Die Verabreichung kann durch Injektion, oral oder topisch erfolgen, z.B. durch Aufbringen eines den Impfstoff und ggf. ein Penetrationshilfsmittel, z.B. ein physiologisch verträgliches organisches Lösungsmittel, wie etwa DMSO enthaltenden Pflasters. Auch hier ist anzumerken, daß die topische Applikation von Peptidimpfstoffen nicht auf die durch das erfindungsgemäße Verfahren erhältlichen Peptidimpfstoffe beschränkt ist, sondern bei beliebigen Peptidimpfstoffen angewendet werden kann.

Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist schließlich eine pharmazeutische Zusammensetzung, die als Wirkstoff Peptidgemische, die durch proteolytischen Abbau von

exogenen Polypeptiden und Proteinen durch zelluläre Prozessierungsenzyme erhältlich sind, ggf. zusammen mit pharmazeutisch üblichen Träger-, Hilfs- und Zusatzstoffen enthält.

Weiterhin soll die Erfindung durch die nachfolgenden Beispiele erläutert werden:

Beispiel 1:

Isolierung von Proteasomen aus kultivierten Zellen

EL-4 Zellen (ATCC TIB39) wurden in RPMI-Medium mit 10 % fetalem Kälberserum, β -Mercaptoethanol, L-Glutamin und Antibiotica in Rollflaschenkulturen bis zu einer Dichte von etwa 1×10^6 Zellen/ml kultiviert. Etwa 2×10^9 Zellen wurden 2 x mit kalter Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen, in 100 ml Imidazolpuffer (20 mM Imidazol-HCl pH 6,8, 100 mM KCl, 20 mM EGTA, 2 mM $MgCl_2$, 10 % Saccharose) resuspendiert und dann einer N_2 -Kavitation ausgesetzt. Die resultierende Suspension wurde anschließend zentrifugiert (15 min bei $1500 \times g$, 15 min bei $15000 \times g$, 90 min bei $150000 \times g$).

10 ml Aliquots des nach dem letzten Zentrifugationsschritt erhaltenen Überstands wurden mit Polyethylenglycol 6000 auf eine Endkonzentration von 5 % (Gew/Vol) versetzt. Nach Inkubation für 30 min bei $4^\circ C$ wurde präzipitiertes Material durch Zentrifugation bei $20000 \times g$ entfernt. Der Überstand wurde auf 12,5 % (Gew/Vol) Polyethylenglycol 6000 eingestellt, zentrifugiert und das resultierende Pellet in 2 ml kaltem Tris-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,2, 1 mM EGTA, 5 mM $MgCl_2$, 2, 0,5 mM β -Mercaptoethanol) aufgelöst. Das resuspendierte Material wurde auf eine Mono-Q (HR5/5)-Säule (Pharmacia, Uppsala, Schweden) aufgebracht, die an ein Waters-HPLC-System (Millipore, Milford, Massachusetts, USA) angeschlossen war. Die gebundenen Proteine wurden mit einem NaCl-Gradienten eluiert; Puffer A (20 mM Tris-HCl pH 7,2), Puffer B (20 mM Tris-HCl pH 7,2, 1 M NaCl), 0-10 min bei 100 % für Puffer A, 10 - 65 min mit einem linearen Anstieg auf 34 % für Puffer B, 65-95 min mit einem linearen Anstieg auf 36 % für Puffer B

(Fließgeschwindigkeit: 0,5 ml/min), 90-105 min mit einem linearen Anstieg auf 100 % für Puffer B (Fließgeschwindigkeit: 1 ml/min). Die Größe der gesammelten Fraktionen war jeweils 0,5 ml.

Die Peptidaseaktivität der Proteasomen wurde fluorometrisch unter Verwendung des Substrats Suc-LLVY-MCA wie von McGuire und Martino (Biochim. Biophys. Acta. 873 (1986), 279-289) beschrieben, bestimmt. Die Säulenfraktionen mit Aktivität (etwa bei 35 % B) wurden vereinigt und die Reinheit der Proteasomen durch Elektrophorese in 12 % Polyacrylamid/SDS-Gelen und 5 % nativen Polyacrylamidgelen und Anfärbung der Proteine durch Silberfärbung bestimmt.

Beispiel 2:

Spaltung synthetischer Polypeptide durch Proteasomen

Die Spaltung synthetischer Polypeptide (20 µg) mit 0,5 µg isolierten Proteasomen wurde in einem Volumen von 300 µl Tris-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 7,8, 1 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, 0,5 mM β-Mercaptoethanol) für 36 h bei 37 °C durchgeführt. Zur Überprüfung der Spaltungsreaktion wurden 30 µl des Gemisches durch Reverse Phase HPLC (Sephasil, C18, 2.1/10 Smart System, Pharmacia, Uppsala, Schweden) aufgetrennt. Das auf die Säule aufgebrachte Material wurde mit einer Fließgeschwindigkeit von 100 µl/min. mit einem Acetonitril-Gradienten eluiert; Lösung A: 0,1 % (Vol/Vol), Trifluoressigsäure (TFA); Lösung B: 0,081 % (Vol/Vol), TFA in 80 % Acetonitril-H₂O; 0-10 min bei 0 % für Lösung B, 10-40 min mit einem linearen Anstieg auf 75 % für Lösung B.

Die Sequenzierung der resultierenden Peptidmischungen erfolgte durch Edman-Abbau mit einem Hewlett Packard Gerät (Modell HP 1005A). Zur Bestimmung der Proteasomen-Spaltstellen wurden die aus der Edman-Sequenzierung erhaltenen Daten wie von Boes et al (J. Exp. Med. 179 (1994), 901-909) beschrieben, ausgewertet.

Beispiel 3:

Test auf Stimulierung cytotoxischer T-Lymphozyten

Als Targetzellen wurden RMA (Ljunggren und Kärre, J. Exp. Med. 162 (1985), 1745 - 1759; Kärre et al, Nature 319 (1986), 675-678), EL-4 (ATCC TIB 39) IC-21 (ATCC TIB 186) Zellen oder 48 h mit ConA-aktivierte Milzzellen in Standard ^{51}Cr Freisetzungssassays verwendet. Die Targetzellen wurden mit 100 μCi ^{51}Cr (New England Nuclear Research Products, Boston, Mass.) für 90 min bei 37 °C markiert und 2 x mit RPMI gewaschen. Die markierten Targetzellen wurden dann durch Vorinkubation mit synthetischen Peptiden oder den Reaktionsprodukten einer Proteasomenspaltung für 2 h bei Raumtemperatur für eine CTL-vermittelte Lyse sensibilisiert, gewaschen und den Effektorzellen (CTLs) zugesetzt.

Beispiel 4:

Immunpräzipitation von Proteasomen

Die Immunpräzipitationen wurden bei 4°C durchgeführt. Zur Reduzierung von eventuell auftretenden unerwünschten Proteinwechselwirkungen mit Protein G - oder A-Sepharose während der eigentlichen Immunpräzipitation wurden Protein G - oder A-Sepharose-Perlen (Pharmacia, Uppsala, Schweden) mit einem detergenzhaltigen Puffer für 30 min. unter Rotation vorinkubiert. Anschließend wurde die Sepharose durch Zentrifugation (3 min. bei 1000 x g) sedimentiert und dreimal mit einem detergenzfreien Puffer gewaschen. 30 μl einer 10%igen (w/v) Lösung dieser Protein G- oder A-Sepharose werden mit 10 μg eines monoklonalen Anti-proteasomenantikörpers (K.B. Hendil, P. Kristensen und W. Verkvtz; Human proteasomes analysed with monoclonal antibodies, Biochem. J. 305 (1995) 245-252) oder mit einem Antiserum für eine Stunde inkubiert. Überschüssige nicht gebundene Antikörper werden durch dreimaliges Waschen der Sepharose-Perlen entfernt. Danach erfolgt die Inkubation der Sepharose mit Zellysat oder Cytosol.

Zur Herstellung von Cytosol wurden Zellen (z.B. T1-Zellen) in Rollflaschenkulturen bis zu einer Dichte von etwa 1×10^6 Zellen pro ml kultiviert. Die Zellen wurden abzentrifugiert, zweimal mit PBS gewaschen und dann mit einer Dichte von 2×10^7 Zellen pro ml in Lysepuffer (20 mM Imidazol, pH 6,8, 100 mM KCl, 20 mM EGTA, 2 mM $MgCl_2$, 10% Saccharose) aufgenommen. Die Zellen wurden anschließend durch Frier-/Tau-Schritte zerstört. Durch Zentrifugation für 15 min. bei $3000 \times g$ wurden die Zellkerne und durch eine Zentrifugation für 15 min. bei $10.000 \times g$ die Mitochondrien und Lysosomen abzentrifugiert. Durch eine Ultrazentrifugation des Überstandes für 90 min. bei $100.000 \times g$ wurden die Mikrosomen entfernt. Der so erhaltene Überstand wurde dann in der Immunpräzipitation eingesetzt.

Zur Durchführung der Immunpräzipitation wurden 30 μ l einer 10%igen Lösung von Protein G- oder A-Sepharose-Perlen, die immobilisierte Antiproteasomenantikörper enthalten, mit 400 μ l Cytosol für eine Stunde unter Rotation inkubiert. Anschließend wurden die Sepharose-Perlen dreimal gewaschen. Durch Messungen der Proteasomen-Aktivität und durch Western-blots des Cytosols und der Sepharose-Lösung konnte das Vorliegen von Proteasomen bestimmt werden. Die erfolgreich durchgeführte Immunpräzipitation zeigte sich durch das Verschwinden der Proteasomen aus dem Cytosol und deren Detektion in der Sepharose-Lösung.

Beispiel 5:

Betrieb eines Enzymreaktors

Proteasomen (20S oder 26S-Proteasomen) wurden mittels der in Beispiel 4 beschriebenen Immunpräzipitation isoliert. Anstelle von Proteasomen können jedoch auch andere Antigenprozessierungsenzyme natürlichen oder rekombinanten Ursprungs verwendet werden, die auch mittels konventioneller Proteinreinigungsmethoden isoliert sein können. Die Enzyme können im Enzymreaktor in löslicher oder immobilisierter Form verwendet werden. Durch konventionelle Reinigungsmethoden gewonnene oder rekombinante

Enzyme können mittels bekannter chemischer Kopplungsmethoden an Sepharose oder andere bekannte Trägermaterialien immobilisiert werden.

Die Proteasomen wurden in einen Enzymreaktor gegeben. In den Enzymreaktor wurden zudem Polypeptide und Proteine rekombinanten, synthetischen oder natürlichen Ursprungs in denaturiertem und reduziertem Zustand gegeben. Der Reaktionspuffer enthielt 20 mM Hepes (pH 7,8), 0,5 mM 2-Mercaptoethanol, 1 mM EGTA und 5 mM $MgCl_2$. Zur Aktivierung der Proteasomen und zur Verbesserung der Löslichkeit der Substrate wurde bei Bedarf ein Detergenz wie z.B. der Puffer SDS (0,003 bis 0,04 % w/v) oder 0,4 M Guanidinium-Hydrochlorid zugegeben. Bei der Verwendung von 26S-Proteasomen wurde Ubiquitin und ATP sowie ein ATP-regenerierendes System hinzugefügt. Die Reaktion wurde bei 37°C für 10 min. bis 24 Stunden durchgeführt. Anschließend wurden die erhaltenen Peptidbruchstücke von den Proteasomen und von eventuell noch vorhandenen eingesetzten Proteinen und anderen Reaktanden durch einen die Austrittsöffnung des Reaktionsgefäßes begrenzenden Filter (Ausschlußgröße der Poren 3000 bis 10.000 Dalton) abgetrennt. Die Abtrennung erfolgte durch niedertourige Zentrifugation oder durch Abpumpen der Reaktionslösung.

Die Peptidgemische wurden so in steriler Form erhalten. Sie können entweder direkt oder nach Mischen mit einem Adjuvans für in vitro- und in vivo-Immunisierungen eingesetzt werden. Weiterhin wurden die Peptidgemische zur Identifizierung von einzelnen antigenen Peptiden, wie in Beispiel 6 beschrieben eingesetzt.

Da die Proteasomen über mehrere Wochen hinweg enzymatisch aktiv sind, konnten sie mehrmals für den Betrieb eines Enzymreaktors verwendet werden.

Beispiel 6:

Identifizierung einzelner antigener Peptidsequenzen

Antigene Proteine oder Polypeptidteile davon (z.B. virale, bakterielle, parasitäre, Tumor- oder Selbstantigene) natürlichen, rekombinanten oder synthetischen Ursprungs wurden mit isolierten 20S- oder 26S-Proteasomen umgesetzt, wobei Peptide einer Größe entstehen, die die Assoziation mit MHC-Molekülen erlaubt. Die Peptidgemische wurden unter Verwendung eines Enzymreaktors (siehe Beispiel 5) erhalten. Die Proteine können aber auch mit löslichen Proteasomen in einem geeigneten Reaktionsgefäß umgesetzt werden, wobei die Reaktion nach 10 min. bis 24 Stunden durch Zugabe von 2%iger Essigsäure gestoppt wird.

Die Identifizierung der antigenen Peptidsequenzen erfolgte folgendermaßen.

(A) Das Peptidgemisch wird mit Reverse-phase HPLC (z.B. auf einer C18 4,6 x 250 mm-Säule) oder mit Kapillarzonen-Elektrophorese aufgetrennt. Ein Aliquot der Fraktionen wurde dann in einem T-Zell-Assay (z.B. Chromium-release-assay, Proliferationstest) unterzogen. In dem T-Zell-Assay wurden unter anderem PHA-stimulierte Blutlymphozyten (PBL), EBV-transformierte B-Zellen und Zellen, die nur ein HLA-Molekül exprimieren (K. Takahashi, L.-C. Dai, T.R. Fuerst, W.E. Biddison, P.L. Earl, B. Moss und F.A. Ennis, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 10277-10281; C.C. Winter, B.M. Carreno, R.V. Turner, S. Koenig und W.E. Biddison, J. Immunology, 146, 3508-3512) als Ziel- oder Stimulatorzellen verwendet. Polyklonale CTL-Linien oder T-Zellklone können in vitro aus peripheren Blutlymphozyten durch den Kontakt mit autologen Epstein-Bar-Virus-transformierten B-Zellen (EBV-B-Zellen) generiert werden. Weiterhin wurden als T-Zellen unspezifisch (z.B. PHA) stimulierte PBL von virusinfizierten Patienten oder von Tumor-Patienten oder PBL bzw. tumorinfiltrierende Lymphozyten (TILL), die spezifisch mit autologen

virusinfizierten Zellen oder Tumorzellen stimuliert wurden, verwendet.

In den positiven Fraktionen wurde anschließend die Sequenz der darin befindlichen Peptide durch Edman-Abbau oder Massenspektrometrie bestimmt. Gegebenenfalls wurden positive Fraktionen noch einer Auftrennung in einer zweiten Dimension unterzogen. Die Schritte Auftrennung des Peptidgemisches, Bestimmung der antigenen Peptidfraktionen im T-Zell-Assay und Sequenzanalyse wurden auch gekoppelt durchgeführt. Das Peptidgemisch wurde dabei über eine Kapillar-HPLC-Säule direkt in ein Massenspektrometer eingeleitet (z.B. Tandem-Elektrospray-Massenspektrometer); wobei der HPLC-Eluent durch einen Split so aufgeteilt wurde, daß ein Teil in das Massenspektrometer und ein anderer Teil in ein geeignetes Reaktionsgefäß (z.B. 96-well-Platte) eingeleitet wurde, in dem dann ein T-Zell-Assay ausgeführt wurde.

(B) Zur Identifizierung der antigenen Peptidsequenzen wurde das Peptidgemisch mit MHC-Molekülen in Kontakt gebracht. Dabei erfolgt zunächst die Assoziation der Peptide des Peptidgemisches an geeignete MHC-Moleküle. Die MHC-Moleküle wurden als an die Zelloberflächen von intakten Zellen (z.B. PBL von Patienten, Zellen, die nur ein bestimmtes HLA-Molekül exprimieren und andere geeignete Zellen) gebundene MHC-Moleküle oder als in Mikrosomen solcher Zellen vorliegende MHC-Moleküle eingesetzt. Weiterhin wurden MHC-Moleküle in isolierter Form verwendet, die an ein Trägermaterial immobilisiert waren. Die MHC-Moleküle wurden dabei durch Immunpräzipitation mit MHC-spezifischen Antikörpern aus Zelllysaten gewonnen, es können aber auch rekombinante MHC-Moleküle eingesetzt werden.

Nach der Inkubation des Peptidgemisches mit den MHC-Molekülen erfolgt die Elution von gebundenen Peptiden aus der Bindungsgrube der MHC-Moleküle mittels Säureelution. Die eluierten Peptide wurden dann mittels Reverse-phase-HPLC oder Kapillarzonen-Elektrophorese aufgetrennt und Aliquots der Fraktionen in einem T-Zell-Assay getestet, wobei in den positiven Fraktionen, wie

unter (A) beschrieben, die Sequenzen der Peptide bestimmt wurden.

Bei der Verwendung von MHC-Molekülen, die keine antigenfremden, "endogenen" Peptide gebunden haben (z.B. rekombinante MHC-Moleküle) erfolgte die Bestimmung der Sequenzen der eluierten Peptide direkt, ohne Auftrennung der Peptidgemische durch Massenspektrometrie.

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Verfahren zur Herstellung und Identifizierung antigener Peptide und Peptidgemische, das die folgenden Schritte umfaßt:
 - (a) proteolytischer Abbau durch zelluläre Prozessierungsmechanismen von exogen zugesetzten Proteinen oder Polypeptiden, die die antigenen Peptide enthalten zu einer Peptidgröße, die eine Assoziation mit MHC-Molekülen erlaubt;
 - (b) Assoziation der in Schritt (a) erhaltenen antigenen Peptide und/oder Peptidgemische mit geeigneten MHC-Molekülen;
 - (c) Isolierung der MHC-Molekül-Peptid-Komplexe;
 - (d) Abtrennung der antigenen Peptide und/oder Peptidgemische von den MHC-Molekülen; und
 - (e) Bestimmung der Aminosäuresequenz der in Schritt (d) erhaltenen antigenen Peptide und/oder Peptidgemische.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die MHC-Moleküle MHC-Klasse I-Moleküle sind.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei der proteolytische Abbau der Proteine oder Polypeptide durch Proteasomen erfolgt.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die MHC-Klasse I-Moleküle aus zellulären Mikrosomen, Zellen eines Patienten oder modifizierten Zellen mit einer Spezifität für ein einziges MHC Klasse I-Molekül stammen.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei man rekombinante MHC Klasse I-Moleküle verwendet.

6. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die MHC-Moleküle MHC-Klasse II-Moleküle sind.
7. Verfahren nach Anspruch 1 oder 6, wobei der proteolytische Abbau der Proteine oder Polypeptide durch endosomale und/oder lysosomale Enzyme, vorzugsweise in Gegenwart der MHC-Klasse II-Moleküle erfolgt.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1, 6 und 7, wobei die MHC Klasse II-Moleküle aus trans-Golgi-Vesikeln, Endosomen, CPLs, Zellen eines Patienten oder modifizierten Zellen mit einer Spezifität für ein einziges MHC Klasse II-Molekül stammen.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1, 6 und 7, wobei man rekombinante MHC Klasse-II-Moleküle verwendet.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei die Proteine oder Polypeptide natürlichen Ursprungs sind.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei die Proteine oder Polypeptide rekombinanten oder synthetischen Ursprungs sind.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei die Isolierung der MHC-Molekül-Peptidkomplexe durch Präzipitation mit Konformationsepitop-spezifischen anti-MHC-Antikörpern erfolgt.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei die Abtrennung der antigenen Peptide und/oder Peptidgemische von den MHC-Molekülen durch Elution, vorzugsweise Säureelution der Peptide und/oder Peptidgemische aus den MHC-Molekülen erfolgt.

14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei der Elution ein Peptidreinigungsschritt unter Verwendung vom HPLC, Gelfiltration oder Kapillarelektrophorese nachfolgt.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, wobei die Abtrennung der antigenen Peptide von den MHC-Molekülen die Identifizierung von Fraktionen umfaßt, die antigenes Peptid enthalten.
16. Verfahren nach Anspruch 15, wobei die Identifizierung der Fraktionen durch einen Standardlysetest mit Hilfe von cytotoxischen T-Zellen erfolgt, die vorzugsweise spezifisch für das Protein oder Polypeptid oder ein das Protein oder Polypeptid enthaltendes Pathogen sind.
17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß man cytotoxische Zellen aus polyclonalen CTL-Linien oder T-Zell-Klonen verwendet.
18. Verfahren nach Anspruch 15, wobei die Identifizierung der Fraktionen durch einen T-Zell-Proliferationstest erfolgt.
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 18, wobei die Bestimmung der Aminosäuresequenz der antigenen Peptide durch Sequenzierung unter Verwendung von vorzugsweise automatischer Edman-Chemie oder Massenspektrometrie erfolgt.
20. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 19, wobei das Protein oder Polypeptid (a) aus einem Pathogen stammt, oder einem Protein oder Polypeptid oder einem Teil davon entspricht, das/der aus einem Pathogen stammt, (b) ein Tumorantigen oder ein Teil davon ist oder (c) ein Autoimmunantigen oder ein Teil davon ist.

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 20, wobei das antigene Peptid ein immundominantes oder subdominantes Peptid ist.
22. Verfahren zur Herstellung und Identifizierung antigener Peptide und Peptidgemische, das die folgenden Schritte umfaßt:
 - (a) proteolytischer Abbau durch zelluläre Prozessierungsmechanismen von exogen zugesetzten Proteinen oder Polypeptiden, die die antigenen Peptide enthalten zu einer Peptidgröße, die eine Assoziation mit MHC-Molekülen erlaubt;
 - (b) Fraktionierung der in Schritt (a) erhaltenen antigenen Peptide und/oder Peptidgemische;
 - (c) Test der erhaltenen Fraktionen in einem T-Zell-Assay, und
 - (d) gegebenenfalls Bestimmung der Aminosäuresequenz der in Schritt (b) erhaltenen antigenen Peptide und/oder Peptidgemische.
23. Verfahren zur Herstellung antigener Peptidgemische, umfassend:
 - (a) proteolytischer Abbau durch zelluläre Prozessierungsmechanismen von exogen zugesetzten Proteinen oder Polypeptiden, die die antigenen Peptide enthalten zu einer Peptidgröße, die eine Assoziation mit MHC-Molekülen erlaubt;
 - (b) Gewinnung der Peptidgemische.
24. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß man den proteolytischen Abbau von Proteinen oder Polypeptiden in einer Vorrichtung durchführt, welche umfaßt:

einen Behälter, der zelluläre Prozessierungsenzyme enthält, die den Abbau der Proteine oder Polypeptide zu einer Peptidgröße bewirken, die eine Assoziation mit MHC-Molekülen erlaubt,

wobei der Behälter mindestens eine Eintrittsöffnung zur Zufuhr von Proteinen und Polypeptiden und mindestens eine Austrittsöffnung zur Entnahme der prozessierten Peptide aufweist.

25. Verfahren nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß die zellulären Prozessierungsenzyme auf einem Trägermaterial oder/und an Wänden des Behälters immobilisiert sind.
26. Verfahren nach Anspruch 24 oder 25, dadurch gekennzeichnet, daß die Prozessierungsenzyme durch chemische Kopplung oder durch Immunadsorption immobilisiert sind.
27. Verfahren nach einem der Ansprüche 24 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß die Austrittsöffnung des Behälters derart ausgebildet ist, daß sie den Durchtritt der prozessierten Peptide, aber nicht den Durchtritt der als Ausgangsmaterial verwendeten Proteine oder Polypeptide und der Enzyme erlaubt.
28. Verfahren nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß die Austrittsöffnung eine Filtrationseinheit umfaßt.
29. Verfahren nach einem der Ansprüche 24-28, dadurch gekennzeichnet, daß der Behälter thermostatierbar ist.

30. Verfahren nach einem der Ansprüche 24 - 29,
dadurch gekennzeichnet,
daß man das Verfahren kontinuierlich durchführt.
31. Verwendung eines nach einem der Ansprüche 1 bis 30 hergestellten antigenen Peptids oder Peptidgemisches zur Identifizierung von Vakzinbausteinen gegen Pathogene oder Tumorzellen oder von kompetitiven oder antagonistischen Peptiden bei Autoimmunkrankheiten.
32. Verwendung von Peptiden oder Peptidgemischen wie sie durch das Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 30 erhältlich sind, zur Herstellung eines Impfstoffes.
33. Verwendung nach Anspruch 32,
dadurch gekennzeichnet,
daß man die durch proteolytischen Abbau erhaltenen Peptidgemische gegebenenfalls nach einer Größenfraktionierung einsetzt, ohne sie vorher in Einzelpeptide aufzutrennen.
34. Verwendung nach Anspruch 32 oder 33,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Impfstoff zusätzlich ein Adjuvans enthält.
35. Verwendung nach einem der Ansprüche 32-34,
dadurch gekennzeichnet,
daß man den Impfstoff mehrmals in Intervallen verabreicht.
36. Verwendung nach einem der Ansprüche 32-35,
dadurch gekennzeichnet,
daß man den Peptidimpfstoff in Kombination mit einem Protein- oder Polypeptid-Impfstoff verabreicht.
37. Verwendung nach einem der Ansprüche 32-36,
dadurch gekennzeichnet,
daß man den Peptidimpfstoff durch Injektion, oral oder topisch verabreicht.

38. Verwendung nach Anspruch 37,
dadurch gekennzeichnet,
daß die topische Verabreichung durch Aufbringen eines den
Impfstoff und gegebenenfalls ein Penetrationshilfsmittel
enthaltenden Pflasters erfolgt.
39. Pharmazeutische Zusammensetzung,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie als Wirkstoff Peptidgemische, wie sie durch das
Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 30 erhältlich sind,
gegebenenfalls zusammen mit pharmazeutisch üblichen Träger-
Hilfs- und Zusatzstoffen enthält.
40. Vorrichtung zum proteolytischen Abbau von Proteinen oder
Polypeptiden, umfassend:
- einen Behälter, der zelluläre Prozessierungsenzyme enthält,
die den Abbau der Proteine oder Polypeptide zu einer
Peptidgröße bewirken, die eine Assoziation mit MHC-Molekü-
len erlaubt,
wobei der Behälter mindestens eine Eintrittsöffnung zur
Zufuhr von Proteinen und Polypeptiden und mindestens eine
Austrittsöffnung zur Entnahme der prozessierten Peptide
aufweist.
41. Vorrichtung nach Anspruch 40,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie weiterhin die Merkmale von einem der Ansprüche 25
bis 29 aufweist.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern al Application No
PCT/EP 95/02593

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 G01N33/68 G01N33/569 C07K1/12 A61K39/00 C12M1/40

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 G01N C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US,A,5 200 320 (A. SETTE ET AL.) 6 April 1993 see the whole document ---	1,2,4-6, 8-22,31, 32,34-39
A	WO,A,92 21033 (MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E. V.) 26 November 1992 ---	
A	WO,A,92 07952 (IMMUNOLOGIC PHARMACEUTICAL CORPORATION) 14 May 1992 ---	
A	JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 175, June 1992 TOKYO, JP, pages 1799-1803, H. KROPSHOFER ET AL. 'Self-peptide released from class II HLA-DR1 exhibits a hydrophobic two-residue contact motif.' ---	
-/--		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 October 1995

Date of mailing of the international search report

15. 11. 95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Griffith, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Patent Application No.

PCT/EP 95/02593

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>NATURE, vol. 259, 1 October 1992 LONDON GB, pages 429-431, A. Y. RUDENSKY ET AL. 'Truncation variants of peptides isolated from MHC class II molecules suggest sequence motifs'</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 95/02593

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US-A-5200320	06-04-93	NONE	
WO-A-9221033	26-11-92	DE-A- 4116256	19-11-92
		AU-A- 1694392	30-12-92
		CA-A- 2103148	18-11-92
		DE-C- 4143467	09-02-95
		EP-A- 0584136	02-03-94
		JP-T- 6510850	01-12-94
WO-A-9207952	14-05-92	AU-B- 1272292	26-05-92
		CA-A- 2095323	01-05-92
		EP-A- 0555418	18-08-93
		JP-T- 6506056	07-07-94

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internales Aktenzeichen

PCT/EP 95/02593

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES		
IPK 6	G01N33/68	G01N33/569 C07K1/12 A61K39/00 C12M1/40
Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE		
Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)		
IPK 6 G01N C07K A61K		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Int. Anspruch Nr.
A	US,A,5 200 320 (A. SETTE ET AL.) 6.April 1993 siehe das ganze Dokument ---	1,2,4- 8-22,31, 32,34-39
A	WO,A,92 21033 (MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E. V.) 26.November 1992 ---	
A	WO,A,92 07952 (IMMUNOLOGIC PHARMACEUTICAL CORPORATION) 14.Mai 1992 ---	
A	JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, Bd. 175, Juni 1992 TOKYO, JP, Seiten 1799-1803, H. KROPSHOFER ET AL. 'Self-peptide released from class II HLA-DR1 exhibits a hydrophobic two-residue contact motif.' ---	
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts
25.Oktober 1995		15.11.95
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Griffith, G

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internales Aktenzeichen
PCT/EP 95/02593

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>NATURE, Bd. 259, 1.Oktober 1992 LONDON GB, Seiten 429-431, A. Y. RUDENSKY ET AL. 'Truncation variants of peptides isolated from MHC class II molecules suggest sequence motifs'</p> <p>-----</p>	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 95/02593

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US-A-5200320	06-04-93	KEINE	
WO-A-9221033	26-11-92	DE-A- 4116256	19-11-92
		AU-A- 1694392	30-12-92
		CA-A- 2103148	18-11-92
		DE-C- 4143467	09-02-95
		EP-A- 0584136	02-03-94
		JP-T- 6510850	01-12-94
WO-A-9207952	14-05-92	AU-B- 1272292	26-05-92
		CA-A- 2095323	01-05-92
		EP-A- 0555418	18-08-93
		JP-T- 6506056	07-07-94